

POLYMERASE CHAIN REACTION UNTUK DETEKSI *M. LEPRAE*

Yohanes Widodo Wirohadidjojo
Jurusan Ilmu Kedokteran Medik
Fakultas Kedokteran, Universitas Gadjah Mada
Yogyakarta

The inability to rapidly identify *M. leprae* is a weak link in the leprosy control program. Acid fast bacilli that are found microscopically are not always *M. leprae*. *Polymerase Chain Reaction* (PCR), which is based on molecular biology, is a new method that is able to multiply *M. leprae* DNA under the direction of a specific primer. This method can rapidly identify *M. leprae*.

The application of PCR in the leprosy control program can help in the collection of some data (such as, the number of infection sources, the number of infected individuals, healthy or ill), but it cannot help in the evaluation of the effect of treatment.

Key Words: PCR, *M. leprae*, leprosy control program.

Pendahuluan

Sampai saat ini penyakit lepra masih merupakan problema besar di beberapa negara di dunia, karena penyakit ini tidak saja infeksius, tetapi juga dapat menyebabkan kecacatan yang akan menimbulkan masalah-masalah sosial ekonomi. Meskipun penggunaan *Multi Drug Therapy* (MDT) diharapkan dapat menurunkan prevalensinya, beberapa data seperti: sumber infeksi, pengelompokan sumber-sumber infeksi, risiko terinfeksi, jumlah infeksi sub-klinis, jumlah yang sakit dan efek pengobatan profilaksis dalam populasi, merupakan data-data penting yang dibutuhkan oleh program pemberantasan lepra (Hartskeerl *et al.*, 1989). Untuk memperoleh data-data, program pemberantasan lepra dibutuhkan suatu alat diagnostik yang sensitif, spesifik dan cepat.

Diagnosis penyakit lepra masih tergantung pada penemuan-penemuan klinis dan bakteriologis yang sifatnya subjektif, sehingga merupakan suatu mata rantai yang lemah dalam pemberantasan lepra (Browne, 1980). Dalam penelitian Etnawati (1990) ditemukan bahwa penyakit lepra biasanya terdiagnosis setelah 2 tahun menderita dan baru terdiagnosis rata-rata dalam waktu 4 atau 5 kali kunjungan. Adanya kenyataan bahwa *M. leprae* masih belum dapat dibiakkan secara *in vitro*, konfirmasi diagnosis yang tepat dan relatif pendek masih belum dimungkinkan. Meskipun pembiakan *M. leprae* dapat dilakukan pada armadillo dan telapak kaki tikus tak berbulu, tetapi teknik ini membutuhkan fasilitas canggih, mahal dan dilakukan selama 6 sampai 12 bulan (Woods, 1991). Pengembangan teknik serologis untuk mengukur antibodi spesifik terhadap PGL-1 maupun protein 36 kDa antigen *M. leprae* masih belum memuaskan banyak pihak. Sebab teknik serologis ini hanya terbukti bermakna pada penderita kelompok multibasiler dan hampir tidak berguna pada kelompok pausibasiler, serta masih belum dapat diramalkan secara pasti kemungkinan sakit tidaknya orang-orang sehat yang seropositif (Fine *et al.*, 1988).

Berdasarkan penelitian biologi molekuler akhir-akhir ini, dikembangkan teknik memperbanyak asam deoksiribonukleat (ADN) dengan menggunakan enzim poli-

merase. Penemuan urutan nukleotid spesifik pada ADN *M. leprae* oleh pelbagai pusat penelitian biologi molekuler (Hartskeerl *et al.*, 1989; William & Gillis, 1991; Woods, 1991) membuka cakrawala baru dalam deteksi *M. leprae* secara sensitif, spesifik dan cepat.

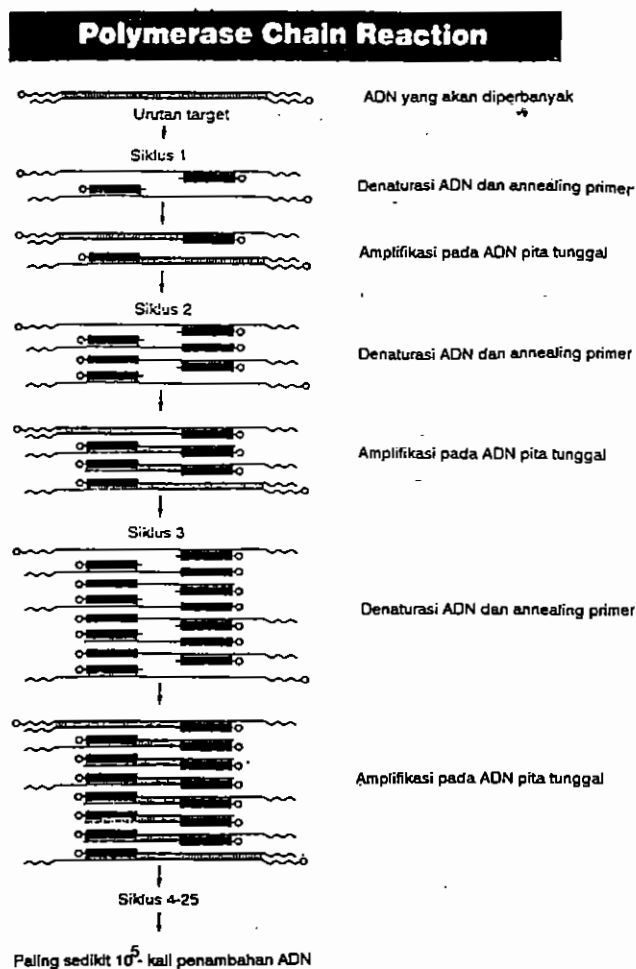
Polymerase Chain Reaction (PCR)

Telah lama diketahui bahwa sifat-sifat baka makhluk hidup, termasuk bakteri dibawa oleh material kimiawi yang dikenal sebagai asam deoksiribonukleat (ADN). ADN berbentuk seperti benang yang saling melilit seperti spiral, membentuk pita helix rangkap dimana setiap pita merupakan rangkaian panjang dari molekul nukleotida. Masing-masing nukleotida tersusun atas: gugus basa, yaitu Adenin (A), Cytosin (C), Guanin (G), Thymine (T); gugus deoksiribose; dan gugus fosfat. Pita atau rangkaian panjang dalam satu jalur terbentuk akibat ikatan kovalen antar nukleotida melalui gugusan deoksiribose dan gugusan fosfatnya. Nukleotida dalam 2 jalur yang berhadapan dihubungkan melalui gugus basa masing-masing nukleotida, dimana hubungan tersebut hanya akan terjadi antara A dengan T dan C dengan G. Sintesis ADN terjadi pada mitosis dan membutuhkan enzim polimerase ADN (Gillis, 1991).

PCR merupakan cara *in vitro* untuk memperbanyak ADN suatu organisme dengan menggunakan enzim polimerase yang diarahkan oleh potongan urutan ADN yang spesifik bagi ADN mikroorganisme tersebut (Flick, 1989). Potongan ADN yang urutannya spesifik bagi mikroorganisme dikenal dengan istilah *probe* karena berperan sebagai penyidik atau primer yang mengawali dan menuntun perbanyakan ADN tersebut (Flick, 1989; Klatser *et al.*, 1991). PCR pertama kali dikembangkan oleh Mullis *et al.* (1986) yang menemukan cara memperbanyak ADN dengan mempergunakan enzim polimerase. Pita ganda ADN didenaturasi (dipisahkan) dengan pemanasan 92°C selama 1 menit, kemudian ditambahkan oligonukleotid sintesis sebagai primer untuk memulai polimerase pada regio spesifik dari masing-masing pita tunggal ADN yang telah dipisahkan. Untuk proses *annealing*, yaitu menempelnya primer pada regio spesifik pada ADN pita tunggal, dibutuhkan pemanasan 60°C selama 2 menit. Pada *annealing* ini berlaku rumus A-T, T-A, C-G dan G-C. Selanjutnya proses elongasi terjadi bila campuran tadi dipanaskan selama 2 menit pada 72°C. Elongasi terjadi karena dalam campuran tadi selain enzim polimerase, sebelumnya juga ditambahkan 4 macam *deoxynucleotide phosphate* yaitu: *deoxyadenosinetriphosphate* (dATP), *deoxyguanosinetriphosphate* (dGTP), *deoxycytosinetriphosphate* (dCTP) dan *deoxythyminetriphosphate* (dTTP). Siklus tersebut dilakukan berulang kali dan pada siklus ke-25 didapatkan perbanyakan ADN menjadi 10^5 kali dari sebelumnya (Flick, 1989).

Selanjutnya ADN yang telah diperbanyak di deteksi dengan menggunakan teknik elektroforesis gel dengan transiluminasi ultraviolet. Oleh karena pemisahan dari pita ganda ADN menjadi 2 pita tunggal ADN digunakan pemanasan, padahal setiap pemanasan akan merusak enzim polimerase, maka setiap 1 siklus PCR selesai, untuk siklus berikutnya selalu ditambahkan enzim polimerase baru. Cara ini membutuhkan enzim dalam jumlah banyak. Kesulitan yang timbul diatasi dengan ditemukannya enzim polimerase yang termotabil. Enzim polimerase yang termotabil ini, dihasilkan dari rekayasa rekombinan ADN, yaitu dengan melakukan kombinasi fragmen ADN dari bakteri *Thermus aquaticus* (*Taq*) atau fragmen ADN dari *Thermus thermophilus* (*Ttb*)

pada ADN *E. coli*. *Taq* dan *Tth* adalah bakteri yang tetap mampu membelah diri dalam temperatur tinggi sehingga enzim polimerasinya bersifat tahan panas. Sayangnya kedua bakteri ini membelah dalam tempo yang lama. Dengan rekayasa rekombinan ADN *E. coli* akan dihasilkan enzim *Taq* polimerase atau *Tth* polimerase dalam jumlah yang banyak dan dalam waktu yang cepat (Srdoch & Fuller, 1989). Dengan menggunakan *Taq* polimerase, tidak lagi dibutuhkan penambahan enzim pada setiap pemanasan pada denaturasi ADN. Dengan ditemukannya *thermocycling machine* pekerjaan PCR menjadi lebih mudah, karena lama dan tingginya pemanasan serta banyaknya siklus dapat berjalan otomatis di bawah kendali komputer.



Sumber: Flick, 1989

Seperti telah diketahui bahwa sifat-sifat baka organisme dibawa oleh ADN, jika spesifik organisme primer tersebut dapat ditentukan, maka ADN yang diperbanyak adalah ADN mikroorganisme tersebut. Dengan demikian, identifikasi suatu ADN berarti identifikasi suatu mikroorganisme. Primer spesifik dari suatu mikroorganisme bisa merupakan spesifikasi jenis mikroorganisme dan bisa juga spesifikasi dari sifat-sifat mikroorganisme tersebut, misalnya: resistensi terhadap antibiotika, patogenisitasnya atau sifat-sifat lain tergantung pada urutan fragmen ADN spesifik yang digunakan sebagai primer atau *probe*.

PCR untuk deteksi *M. leprae*

A. Prinsip-prinsip dasar

1. Primer yang digunakan

Sejauh ini dikenal paling sedikit 3 macam primer yang dapat dipergunakan untuk menuntun perbanyakan ADN *M. leprae*. Hartskeerl *et al.* (1989) menggunakan primer S-13 dan S-62, dimana primer bekerja pada urutan 530 pasang basa antigen 36 kD. Primer S-13 dan S-26 ini telah teruji pada ADN 25 spesies bakteri dan hanya positif untuk *M. leprae*. Batas deteksi terkecil adalah 10 bakteri dengan 32 siklus PCR. Di Laboratorium Pusat Penyakit Lepra Nasional Amerika Serikat, perbanyakan ADN mempergunakan primer yang mengarahkan perbanyakan ADN pada fragmen 360 pasang basa dari gena 18 kDa (William & Gillis, 1991) dibutuhkan 40 siklus PCR untuk mendeteksi batas terkecil 100 bakteri. Primer lainnya adalah primer yang digunakan oleh Institut Pasteur Paris, yaitu primer yang bekerja pada 714 pasang basa dari gena 65 kDa dan 372 pasang basa dari gena 18 kDa. Batas deteksi terkecil adalah 100 bakteri, dengan 40 siklus PCR (Woods, 1991). Primer ini telah teruji pada 6 jenis bakteri dan hanya positif untuk *M. leprae*.

2. Membuat suspensi bakteri

Di lapangan, material bakteriologis diambil dari usapan mukosa hidung dan usapan irisan kulit, sedangkan di pusat-pusat lepra biasanya dibutuhkan identifikasi *M. leprae* dari biopsi kulit dan biopsi syaraf tepi (WHO, 1980). Sebelum perbanyakan ADN dengan PCR, ADN harus diekstraksi dari bakteri, sedangkan sebelum ekstraksi, material bakteriologis harus dibuat menjadi suspensi terlebih dahulu. Material dari usapan mukosa hidung dan usapan irisan kulit dapat langsung dibuat menjadi suspensi dengan menambahkan dan mensentrifusikan dalam larutan Hank, sedangkan biopsi kulit yang segar harus dibekukan lebih dahulu, digerus baru kemudian dibuat suspensi (William & Gillis, 1991).

2.a. Suspensi bakteri dari biopsi syaraf tepi

Telah diketahui bahwa identifikasi *M. leprae* bagi pasien pausibasiler sulit dilakukan, mengingat kandungan bakteri pada lesi kulit yang sangat sedikit, sehingga perlu dilakukan identifikasi bakteri pada syaraf tepi. Pada pasien pausibasiler, *M. leprae* dijumpai pada sel Schwan serabut syaraf (Bryceson & Pfaltgraff, 1979), sehingga untuk identifikasi dengan PCR, bakteri harus dibebaskan dari serabut syaraf dengan

menggunakan enzim hidrolitik seperti kolagenase (Hartskeerl *et al.*, 1989). Cara dengan enzim ini dianggap tidak produktif, karena hasilnya sangat bervariasi, sehingga disarankan untuk membekukan potongan syaraf, digerus, dilarutkan dalam larutan garam bufer dan dipanaskan 95°C selama 5 menit (Woods, 1991).

2.b. Suspensi dari Blok Parafin

Meskipun hasil pemeriksaan histopatologi merupakan informasi penting untuk menegakkan diagnosis dan sekaligus menentukan spektrum penyakit lepra, kadang-kadang dijumpai juga ketidakcocokan antara histopatologis dan gambaran klinis. Di sini identifikasi *M. leprae* mungkin dapat membantu menyelesaikan ketidakcocokan tersebut, terutama pada spektrum-spektrum miskin bakteri seperti tuberkuloid dan indeterminate.

Sebelum suspensi bakteri dibuat, blok parafin dari biopsi kulit dipotong seperti persiapan untuk pembacaan histopatologis, dan dideparafinisasi dengan xylol dan aseton, kemudian potongan tersebut digerus dan dibuat suspensi dengan larutan bufer garam normal (Klatser *et al.*, 1991; Woods, 1991). Klatser *et al.* (1991) menemukan potongan histopatologis dengan pulasan *Ziehl Neelsen* (ZN) yang tidak mengandung *M. leprae*, ternyata dengan PCR lebih dari 50% terbukti mengandung *M. leprae*.

3. Ekstraksi ADN dari suspensi bakteri

Sebelum perbanyakkan ADN dalam siklus PCR dimulai, ADN dalam bakteri harus diekstraksi terlebih dahulu. Sebelum ekstraksi, bakteri harus dilepaskan dari material klinik dan untuk melisiskan bakteri dikenal beberapa teknik, yaitu:

a. Teknik Freezing dan Thawing

Merupakan teknik paling sederhana untuk membebaskan ADN dari bakteri. Suspensi bakteri didinginkan pada minus 80°C selama 15 detik dan dengan cepat dipanaskan dalam temperatur 95°C selama 5 detik. Dari beku dan tiba-tiba menjadi panas, akan menyebabkan dinding sel bakteri pecah, sehingga ADN dapat diekstraksi dengan mudah. Untuk metode ini dibutuhkan freezer dengan nitrogen cair yang mampu mendinginkan material sampai minus 80°C. Dengan cara ini, ADN yang diekstraksi tidak mengalami perubahan viabilitas maupun ultrastruktural (Woods & Cole, 1989).

b. Dengan enzim Proteinase K dan Tween 20

Merupakan metode alternatif bila freezer seperti di atas tidak tersedia. Pada prinsipnya, suspensi bakteri diinkubasikan dengan enzim proteinase K dan Tween 20 selama 18 jam pada temperatur 60°C. Enzim dan Tween 20 ini akan merusak dinding sel bakteri, sehingga ADN dapat diekstraksi. Dengan metode ini hampir semua ADN dari bakteri dapat diekstraksi, tetapi sebelum dicampur dengan campuran PCR, enzim ini harus dinaktifkan dengan cara memanaskannya dalam temperatur 95°C dalam waktu 8 menit. Jika tidak dinaktifkan, proteinase K dapat merusak *Taq* polimerase dalam campuran PCR (Klatser *et al.*, 1991).

c. Dengan Lisozim dan Proteinase K

Suspensi bakteri diinkubasikan dengan proteinase K 65°C selama 60 menit, setelah proteinase K dinaktifkan dengan pemanasan 95°C selama 8 menit, suspensi diinkubasikan dengan lisozim selama 30 menit dalam temperatur 37°C. Dibandingkan dengan metode kombinasi proteinase K dan Tween 20 di atas, metode terakhir ini lebih hemat waktu, tetapi biayanya lebih mahal karena menggunakan 2 macam enzim dan kadang-kadang dibutuhkan inkubasi ulang dengan proteinase K bila jumlah bakteri lebih dari 10^3 (William & Gillis, 1991). Setelah melisis bakteri, ADN yang tersedia dalam suspensi harus diekstraksikan sebelum dicampur dengan campuran PCR. Ekstraksi ADN dengan cara klasik, dengan menggunakan Chloroform-etanol. Selanjutnya ADN hasil ekstraksi dilarutkan dengan air suling steril dalam pelbagai konsentrasi.

4. Perbanyakkan ADN dengan PCR

ADN yang diperoleh dari ekstraksi material klinik, dicampur dengan campuran PCR, yaitu terdiri dari *Taq* polimerase, primer, nukleotida: dATP, dCTP, dTTP dan dGTP; dalam larutan bufer yang telah diberi larutan *Dimethyl Sulfoxide* (DMSO). DMSO berguna untuk mempertahankan denaturasi pita tunggal ADN selama proses *annealing* dan elongasi yang diketahui berada dalam temperatur yang lebih rendah dari temperatur denaturasi (Klatser *et al.*, 1991). Biasanya tahapan PCR yang digunakan adalah: denaturasi dengan pemanasan selama 2 menit pada 94°C, *annealing* berupa pemanasan 2 menit pada 60°C dan elongasi melalui pemanasan pada 72°C selama 3 menit. Jumlah siklus yang dibutuhkan tergantung pada perkiraan jumlah bakteri dalam suspensi dan jenis primer yang digunakan. Untuk primer S-13 dan S-62 dan jumlah bakteri per cc lebih dari 10 dibutuhkan 35 siklus (Hartskeerl *et al.*, 1989).

5. Identifikasi ADN dari PCR

Untuk melihat apakah primer yang dipergunakan dapat menuntun perbanyakkan ADN dari material klinik, hasil reaksi PCR perlu diidentifikasi ada tidaknya ADN. Identifikasi ADN dilakukan dengan metode elektroforesis pada gel agarose yang mengandung ethidium bromida, dengan kuat arus 100 mA. Pergerakan ADN ke arah kutub positif dapat dilihat dengan eflorescensi ethidium bromida akibat penyinaran dengan sinar ultraviolet.

Kuatnya signal eflorescensi ternyata berhubungan dengan banyaknya ADN yang ditarik oleh muatan listrik dalam elektroforesis tersebut. Dalam suatu penelitian, dimana intensitas signal diukur secara subyektif, intensitas signal berhubungan dengan konsentrasi bakteri dalam suspensi sebelum dilakukan ekstraksi ADN (Woods & Cole, 1989); tetapi untuk kuantifikasi pengukuran hasil PCR masih harus dikembangkan, mungkin dengan densitometri intensitas signal PCR (William & Gillis, 1991; Woods, 1991). Menurut Klatser *et al.* (1991), setiap satu sel *M. leprae* mengandung ADN seberat 5 fentogram; tetapi kuat tidaknya signal elektroforesis, selain tergantung pada jumlah bakteri, masih tergantung pada jenis primer dan banyaknya siklus PCR yang dikerjakan. Seperti diketahui masing-masing primer yang berbeda bekerja pada urutan nukleotida gena spesifik, dimana jumlah nukleotida pada masing-masing gena tidak sama, sehingga jumlah nukleotida yang diperbanyak berbeda pula. Selain itu, semakin banyak siklus

PCR, asal tersedia *Taq* polimerase dan nukleotida-nukleotida yang cukup, akan semakin banyak menghasilkan ADN.

B. Kelebihan dan kelemahan PCR dalam kontrol lepra

B.1. Kelebihan PCR

Seperti yang disebutkan di depan, identifikasi *M. leprae* dengan PCR menunjukkan sensitifitas dan spesifisitas yang tinggi. Dengan pemeriksaan mikroskopis pada sedimen ZN seperti yang dianjurkan oleh Ridley (1958, cit. WHO, 1980) mempunyai beberapa kelemahan, diantaranya: bakteri batang tahan asam yang terlihat dalam medan pandangan belum tentu *M. leprae*, bahkan sering tercampur dengan *M. avium* (Kato, 1984), untuk menilai diperlukan tenaga yang cukup terampil dan metode ini umumnya gagal menunjukkan ada tidaknya bakteri terutama dari lesi-lesi penderita lepra miskin bakteri (pausibasiler).

Sensitifitas dan spesifisitas PCR tergantung pada primer yang digunakan, dan primer S-13 dan S-62 terbukti mampu membedakan *M. leprae* dari 25 spesies bakteri yang berbeda, 17 diantaranya spesies mikobakterium selain *M. leprae* dan dengan 32 siklus PCR mampu mendeteksi 10 bakteri per cc (Hartskeerl *et al.*, 1989). Dengan sensitifitas dan spesifisitas yang tinggi ini, PCR mampu mendeteksi *M. leprae* secara akurat dan dalam waktu yang cepat. Dengan PCR identifikasi telah selesai dikerjakan dalam waktu kurang dari 48 jam (Woods, 1991), sehingga konfirmasi diagnosis dapat dilakukan secara cepat. Selain itu dengan PCR dapat ditentukan penderita pausibasiler, orang sehat karier dan sumber-sumber penularan lain (seperti alat-alat rumah tangga, lantai dan pakaian yang sejauh ini masih belum jelas perannya dalam penularan penyakit lepra, meskipun telah diketahui bahwa *M. leprae* dapat tetap hidup 3 hari setelah keluar dari tubuh penderita) (Davey & Rees, 1974). Dengan teridentifikasinya sumber-sumber infeksi dan sifat-sifatnya, program pemberantasan penyakit lepra akan berjalan lebih baik.

B.2. Kelemahan PCR

Kelemahan utama dari PCR adalah besarnya biaya yang harus dikeluarkan, tanpa memandang harga perangkat kerasnya (*thermocycling machine*), alat untuk elektroforesis, alat untuk transiluminasi ultraviolet, freezer dan mikropipet. Harga reagen per tes sekitar US \$2.50 (Anonim, 1991).

Kelemahan yang lain adalah ketidakmampuan PCR membedakan antara *M. leprae* yang hidup dan yang mati. Kelemahan ini disebabkan tidak saja karena PCR memperbanyak ADN kuman yang hidup, tetapi juga memperbanyak ADN kuman yang telah mati (Woods, 1991). Dengan adanya kelemahan ini, PCR tidak dapat digunakan untuk mengevaluasi hasil pengobatan pada penderita lepra. Kelemahan lain dari PCR adalah hasil pengukurannya dalam skala nominal, sehingga analisis inferensial yang mungkin membutuhkan data-data dalam skala ordinal, interval atau rasional tidak dapat semata-mata mengacu pada hasil PCR.

Kesimpulan

Polymerase Chain Reaction (PCR) merupakan metode memperbanyak ADN dengan mempergunakan primer spesifik untuk ADN sehingga dapat dipergunakan untuk identifikasi sel, bakteri atau virus, beserta sifat-sifat spesifiknya tergantung pada primer yang digunakan. PCR dapat digunakan untuk identifikasi *M. leprae* dengan cepat, dengan sensitifitas dan spesifisitas yang tinggi. Sehingga dapat dipergunakan untuk mendeteksi *M. leprae* dari karier, penderita miskin bakteri dan sumber-sumber penularan lain yang selama ini sulit dilakukan. Keterbatasan PCR adalah ketidakmampuannya membedakan kuman yang hidup dan yang mati, sehingga PCR tidak dapat menilai efek terapi secara memuaskan. Selain itu kuantifikasi signal PCR masih harus dikembangkan, agar hasil pembacaannya tidak terbatas pada skala nominal saja.

Kepustakaan

- Anonim 1991 Addendum VI: cost analysis of PCR's reagents. *Workshop on PCR Technology for The Detection of Mycobacterium leprae*. Leprosy Division, Sasakawa Research Building, Nonthaburi, Thailand.
- Browne, S.G. 1980 *The Diagnosis and Management of Early Leprosy* (4th ed.). The Leprosy Mission, London.
- Bryceson, A., & Pfaltzgraff, R.E. 1979 *Leprosy* (2nd ed.). Churchill Livingstone, New York.
- Davey, T.F., & Rees, R.J.W. 1974 The nasal discharge in leprosy: clinical and bacteriological aspects. *Lepr. Rev.* 45: 121-134.
- Etnawati, K. 1990 Kewaspadaan petugas kesehatan terhadap lepra. *Berita Kedokteran Masyarakat* VI (2): 157 - 163.
- Fine, P.E.M., Ponnighaus, J.M., Burgess, P., Clarkson, J.A., & Draper, C.C. 1988 Seroepidemiological studies of leprosy in Northern Malawi based on an enzyme-linked immunosorbent assay using synthetic glycoconjugate antigen. *Int. J. Lepr.* 56: 243.
- Flick, P.K. 1989 *Taq* DNA Polymerase: application in PCR. *Spring* 16 (1): 1-7.
- Gillis, T.P. 1991 Principles of DNA structure and replication. *Workshop on PCR Technology for The Detection of Mycobacterium leprae*. Leprosy Division, Sasakawa Research Building, Nonthaburi, Thailand.
- Hartskeerl, R.A., de Wit, M.Y.L., & Klatser, P.R. 1989 Polymerase Chain Reaction for the detection of *Mycobacterium leprae*. *J. Gen. Microbiol.* 135: 2357.
- Kato, L. 1984 *Mycobacterium* x identified as *Mycobacterium avium* intracellulare (probably mixed with *M. leprae* in early subcultures). *Int. J. Lepr.* 52: 538-540.
- Klatser, P.R., de Wit, M.Y.L., & Vander Vliet, G.M.E. 1991 Polymerase Chain Reaction for the detection of *Mycobacterium leprae*. *Workshop on PCR Technology for The Detection of Mycobacterium leprae*. Sasakawa Research Building, Nonthaburi, Thailand.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., & Erlich, H. 1986 Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the Polymerase Chain Reaction. *Symp. Quant. Biol.* pp. 51, 263.
- Srdock, C.L., & Fuller, C.W. 1989 DNA sequencing using a thermostable DNA polymerase. *Spring* 16: 1-5.
- WHO 1980 *A Guide to Leprosy Control*. WHO, Geneva.
- William, D.L., & Gillis, T.P. 1991 Identification of *M. leprae* by PCR. *Workshop on PCR Technology for The Detection of Mycobacterium leprae*. Leprosy Division, Sasakawa Research Building, Nonthaburi, Thailand.
- Woods, S.A., & Cole, S.T. 1989 A rapid method for the detection of potentially viable *M. leprae* in human biopsies: a novel application of PCR. *FEMS Microb. Lett.* 65: 305-310.
- Woods, S.A. 1991 PCR and leprosy: application. *Workshop on PCR Technology For The Detection of Mycobacterium leprae*. Leprosy Division, Sasakawa Research Building, Nonthaburi, Thailand.